

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/108, 39/00, 39/35 // (A61K 39/108, 39:00) (A61K 39/108, 39:00) (A61K 39/35, 39:108)	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/39029 (43) Date de publication internationale: 11 septembre 1998 (11.09.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00030 (22) Date de dépôt international: 5 mars 1998 (05.03.98) (30) Données relatives à la priorité: 9700199 5 mars 1997 (05.03.97) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES [BE/BE]; Avenue F.D. Roosevelt 50, B-1050 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUCHATEAU, Jean [BE/BE]; Rue des Champs-Elysées 60, B-1050 Bruxelles (BE). SERVAIS, Geneviève [BE/BE]; Chemin de la Noire Agasse 2, B-7060 Horrues (BE). (74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: PHARMACEUTICAL OR FOOD COMPOSITION FOR TREATING PATHOLOGIES RELATED TO GRAFT VERSUS HOST, ALLERGIC OR AUTOIMMUNE REACTION (54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE OU ALIMENTAIRE POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIEES A UN REJET DE GREFFE, UNE REACTION ALLERGIQUE OU AUTO-IMMUNE (57) Abstract The invention concerns a pharmaceutical and/or food composition comprising a suitable pharmaceutical and/or food vehicle and a heat shock protein and at least conformation or sequential epitopes of an antigenic structure inducing a graft versus host, an allergic or autoimmune reaction. (57) Abrégé La présente invention concerne une composition pharmaceutique et/ou alimentaire comprenant un véhicule pharmaceutique et/ou alimentaire adéquat ainsi qu'une protéine de stress et au moins un des épitopes conformationnel ou séquentiel d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE OU ALIMENTAIRE POUR LE
10 TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIÉES A UN REJET DE GREFFE, UNE
RÉACTION ALLERGIQUE OU AUTO-IMMUNE

Objet de l'invention

La présente invention est relative à une
15 nouvelle composition pharmaceutique ou alimentaire destinée
au traitement de pathologies liées à un rejet de greffe,
une réaction allergique ou auto-immune.

Arrière-plan technologique à la base de l'invention

20 Depuis une douzaine d'années, des études
contrôlées décrivent la désensibilisation reposant sur
l'administration orale d'allergènes (1). Cette méthode se
fonde sur le fait que l'administration orale d'un antigène
facilite l'acquisition d'une tolérance immunologique à son
25 égard. La voie digestive constitue le mode de contact de
l'organisme avec des antigènes, d'origine alimentaire ou
microbienne. Cependant, les réactions allergiques sont
rares. L'administration per os de globules rouges de mouton
(GRM) à des rats empêche ceux-ci de produire plus tard des
30 anticorps anti-GRM après une injection sous-cutanée, alors
que sans prise orale préalable, la réponse allergique eut
été présente. Ce phénomène constitue immunologiquement ce

que l'on appelle la tolérance orale.

Cette méthode de désensibilisation per os a été validée dans des études prospectives et contrôlées, et permet de réduire les risques d'anaphylaxie, en particulier
5 pour le pollen de bouleau et les acariens. Elle est déjà accessible sur le marché des vaccins par une présentation sous forme buvable (vendue par la société Laboratoire des Stallergènes - Paris).

Par ailleurs, on peut considérer que le
10 bénéfice en terme de protection de l'allergie au lait des nourrissons qui est constaté depuis l'introduction de nouvelles formules de laits en poudre prédigérés enzymatiquement résulterait de l'induction de tolérances immunologiques par la présentation des antigènes sous forme
15 de peptides.

Cependant, il est difficile de prédire ou constater l'efficience de la désensibilisation. L'observation clinique permet, après coup, de constater ou non l'amélioration éventuelle des symptômes.

20 Il est connu par la demande de brevet internationale WO96/36880 de pouvoir détecter et/ou quantifier des ligands spécifiques d'une pathologie liée à une réponse allergique, auto-immune ou du cancer du poumon, par un test de compétition entre des ligands présents dans
25 un échantillon avec d'autres ligands discriminables. Ce test se base sur le fait que les sujets allergiques et symptomatiques reconnaissent par leurs anticorps des épitopes différents de ceux reconnus par les anticorps de sujets tolérants sur la même structure antigénique
30 spécifique de ladite pathologie. Ce document décrit en outre la possibilité de mesurer l'évolution de cette spécificité, en particulier dans le cas d'enfants

allergiques au lait, et l'évolution vers l'acquisition in vivo de la tolérance au lait.

Buts de l'invention

5 La présente invention a pour but de fournir une nouvelle composition qui peut être de type pharmaceutique ou alimentaire visant à modifier la réponse immunitaire de patients vis-à-vis d'une pathologie liée à une réaction allergique, auto-immune ou vis-à-vis de
10 phénomènes de rejet de greffe, de manière à ce que la réponse immunitaire desdits patients se rapproche de la tolérance naturelle manifestée par des sujets normaux (qui demeurent asymptomatiques bien que susceptibles d'être exposés aussi à cette pathologie).

15 La présente invention vise également à fournir une composition pharmaceutique ou alimentaire de faible coût, dont l'administration soit aisée et qui puisse être utilisée de manière prophylactique et/ou thérapeutique.

20

Éléments caractéristiques de l'invention

La présente invention concerne une composition pharmaceutique ou alimentaire comprenant un véhicule pharmaceutique ou alimentaire adéquat, une
25 protéine de stress (dénommée également "heat shock protein" ou HSP) et au moins un des épitopes (conformationnel ou séquentiel) d'une structure antigénique, ladite structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou une réaction auto-immune. De préférence, le
30 véhicule pharmaceutique ou alimentaire de la composition est adéquat pour une administration par voie mucosale (notamment par voie orale) ou cutanée.

Avantageusement, la protéine de stress et l'épitope forment un complexe de manière naturelle (c'est-à-dire sans formation de lien covalent) comme décrit par Roamn et al., Febs (1994), Fouri et al., The Journal of
5 Biological Chemistry, Volume 269 n° 48, pp. 30470-30478 (1994), Palleros et al., The Journal of Biological Chemistry, Volume 269 n° 48, pp. 13107-13114 (1994), Grageroov et Gottesman, Journal of Molecular Biology, n° 241, pp. 133-135 (1994), et Schmid et al., Science,
10 Volume 260, p. 1991 (1994) incorporés ci-dessous par référence.

Selon l'invention, l'épitope (dénommé également déterminant antigénique) est obtenu par une hydrolyse de préférence enzymatique, notamment à la
15 pepsine, de ladite structure antigénique.

De manière avantageuse, la protéine de stress est une protéine bactérienne de stress, par exemple présente dans les bactéries saprophytes telles que E. coli.

Parmi les protéines de stress de la présente
20 invention, on peut mentionner la protéine de stress GroEL, les protéines de stress GrpE, DnaK ou DnaJ telles que notamment décrites par Hendrick et Hartl (Annual Review of Biochemistry, n° 62, p. 349 (1993)) ou les heat shock proteins HSP 60, 70, ...

25 On entend par "phénomène de rejet de greffe, réaction allergique ou auto-immune", les réactions d'hypersensibilité de type immédiat ou différé provoquées pour le contact notamment avec un allergène (cette réaction peut être immédiate et spécifique (anaphylaxie, urticaire,
30 etc.) ou différée dans le temps) ou les maladies auto-immunes et les désordres du système immunitaire de type immédiat ou différé liés aux rejets de greffes de type hôte

contre greffe et greffe contre hôte.

L'auto-immunité est un état d'immunisation d'un sujet contre ses propres constituants et le phénomène de rejet de greffe est un état d'immunisation d'un sujet
5 contre des constituants étrangers (fluides corporels tels que sang, liquide céphalo-rachidien, ..., cellules, tissus, organes, anticorps, ...) implantés de manière volontaire chez le patient. Ces phénomènes sont en particulier observés dans les pathologies choisies parmi le groupe
10 constitué par les infections liées au SLE (Systemic Lupus Erythematosus disease), le syndrome Gougerot-Sjögren (ou pathologie Sjögren), la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que les pathologies du type sarcoïdosis et osteopenia, la spondylarthrite, la scleroderma, la sclérose en plaques
15 (multiple sclerosis), la sclérose amyotrophique latérale, l'hyperthyroïdisme, la maladie d'Addison, l'anémie hémolytique auto-immune, la maladie de Crohn, le syndrome de Goddpasture, la maladie de Graves, la thyroïdite d'Hashimoto, l'hémorragie purpurale idiopathique, les
20 diabètes insulino-dépendants, la myasthénie, le pemphigus vulgaris, l'anémie pernicieuse, le glomerulonephritis poststreptococcal, le psoriasis et la stérilité spontanée, ainsi que les phénomènes immédiats ou différés observés lors de rejets de greffe.

25 On entend par "structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune", des allergènes, de préférence choisis parmi le groupe constitué par les antigènes majeurs allergiques présents dans les aliments tels que les oeufs, le soja, le
30 lait, en particulier la bêta-lactoglobuline bovine (BLG), issue du lait de vache, les antigènes majeurs allergiques présents dans les végétaux, les moisissures, les

médicaments (en particulier les antibiotiques), les pollens, les antigènes majeurs allergiques présents dans les animaux, en particulier dans les poils, le venin, en particulier le venin de guêpe, les antigènes majeurs de la-
5 réaction allergique aux acariens, à la mite présente dans la poussière de maison (antigène P1 Dermatophagoïdes pteronyssinus), l'antigène majeur de l'*Aspergillus fumigatus*, et l'entérotoxine B staphylococcale (SEB).

D'autres exemples non limitatifs d'allergènes
10 ou mélanges d'allergènes ont également été décrits dans la publication ISBN-91-970475-5-4 de Pharmacia AB incorporée ici par référence.

La "structure antigénique" peut également être un complexe antigénique induisant une maladie auto-
15 immune. De préférence, cette structure antigénique est spécifique du lupus (SLE) ou de la pathologie de Sjögren, en particulier la membrane plasmatique ou une portion de cette membrane contenant du DNA membranaire ayant un poids supérieur à 100 KD, tel que notamment décrit dans la
20 demande de brevet WO96/13723 dont le numéro de publication est incorporé par référence.

D'autres exemples non limitatifs de complexes antigéniques induisant des maladies auto-immunes ont également été décrits par Roitt I. M. (Essential
25 Immunology, Blackwell Scientific Publication (ch. 14) ISBN 0-632-01994-8) et par Humbel R. L. (Auto-anticorps et maladies auto-immunes, Ed. Scientifiques Elsevier (1994) ISBN 2-906077-58-5).

Cette structure antigénique peut également
30 être un locus majeur d'histocompatibilité (MHC I et/ou MHC II) ou une portion de celui-ci spécifique d'un individu et intervenant dans les phénomènes de rejet de greffes (y

compris les transfusions de fluides corporels).

Le véhicule pharmaceutique ou alimentaire adéquat selon la présente invention peut être n'importe quel additif ou support, tel qu'une substance compatible. 5 non toxique pour l'administration de la composition selon l'invention à un patient. Le type de véhicule pharmaceutique ou alimentaire adéquat utilisé dépendra du mode d'administration choisi. En particulier, pour l'administration orale, ceux-ci peuvent consister en des solutions aqueuses, des sirops, des tablettes, des 10 capsules, etc. D'autres véhicules pharmaceutiques tels que des crèmes ou des onguents peuvent être choisis en fonction du type d'administration, en particulier pour des administrations cutanées.

15 L'homme du métier peut également adapter le véhicule pharmaceutique en fonction d'une administration subcutanée, intradermale, intraveineuse, intramusculaire, parentérale, par voie d'inhalation nasale ou buccale, etc.

Le pourcentage de composé actif présent dans 20 la composition selon l'invention dépendra du type de patient et de pathologie traité et de la voie d'administration. Les doses seront uniquement limitées par la tolérance du produit par le patient, ainsi que par les fréquences d'administration.

25 Les concentrations d'administration seront en particulier choisies de manière à ce que les signes et symptômes des pathologies susmentionnées soient réduits, de préférence supprimés, par les doses d'administration prévues par la posologie.

30 De manière inattendue, les Inventeurs ont découvert que l'utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'invention permet

de modifier la réponse immunitaire d'un patient induite par ladite structure antigénique. La modification de la réponse immunitaire d'un patient peut notamment être détectée et quantifiée selon le procédé et la technique décrits dans la
5 demande de brevet WO96/36880 ou par toute méthode d'analyse clinique du patient traité (y compris de manière prophylactique) bien connue de l'homme du métier.

Un autre aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition selon l'invention
10 pour la préparation d'un médicament destiné à modifier la réponse immunitaire d'un patient vis-à-vis d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune. En particulier, la présente invention concerne l'utilisation de la composition
15 pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la désensibilisation d'allergies atopiques ou non atopiques.

Un autre aspect de la présente invention concerne l'utilisation de la composition pharmaceutique
20 et/ou alimentaire selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement des réactions allergiques, des maladies auto-immunes susmentionnées, au traitement ou à la prévention de rejets de greffe, éventuellement en combinaison avec un produit
25 spécifique pour diminuer ou neutraliser les réactions allergiques, les réactions auto-immunes et les phénomènes de rejet de greffe (en particulier l'administration d'immunosuppresseurs tels que l'azathioprine, les stéroïdes, les globulines anti-lymphocytaires, la
30 cyclosporine A, la rapamycine, le KF-506 (tacrolimus) ou des lymphokines (en particulier l'IL-10), leurs analogues et leurs agonistes bien connus de l'homme du métier.

On entend par "analogues et agonistes" de ces molécules, d'autres molécules, ou des dérivés de ces molécules, agissant sur le même récepteur ou via le même mécanisme d'action que les produits spécifiques-
5 susmentionnés.

La présente invention concerne également un procédé de traitement thérapeutique ou prophylactique d'un patient comprenant l'étape d'administration de la composition selon l'invention audit patient de manière à
10 modifier la réponse immunitaire du patient vis-à-vis d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune.

La présente invention sera décrite de manière plus détaillée en référence aux figures décrites dans les
15 exemples d'exécution ci-dessous.

Exemples

A. Base du modèle considéré

a) Utilisation de la voie orale

20 L'administration orale permet une induction de tolérances immunologiques, et est appliquée de façon de plus en plus étendue dans le domaine de la désensibilisation anti-allergique. Elle demande cependant l'usage de quantités plus importantes d'antigènes que par
25 voie parentérale, et doit s'étendre sur des périodes d'au moins plusieurs années (2, 3). L'optimisation du régime des doses administrée et de leur périodicité est adaptable par l'homme du métier de manière à éviter les réactions syndromiques (réplication de la symptomatologie allergique
30 en cas de surdosage), qui sont fréquentes mais non dangereuses en raison de la progressivité lente de l'augmentation des doses administrées (2).

b) Utilisation de complexes peptides-protéines de stress

Les protéines de stress (heat shock proteins (HSP)) constituent une série de familles de protéines, très bien conservées durant l'évolution depuis les bactéries-
5 jusqu'à l'homme, et qui ont la capacité de se lier aux peptides ou aux protéines dont la structure conformationnelle est altérée ou en voie de conformation définitive (4).

Elles ont plusieurs rôles dont la
10 participation au transport intracellulaire menant à l'assemblage polypeptidique pour la synthèse de certaines protéines ou leur élimination. Certaines sont exprimées à la surface de différentes cellules et peuvent contribuer à la présentation antigénique, en particulier à des
15 lymphocytes T aux récepteurs pour antigène de type gamma-delta, qui colonisent les muqueuses et les organes lymphoïdes associés à la muqueuse digestive.

La présentation antigénique par l'intermédiaire des HSP de la famille HSP70, aux
20 lymphocytes T gamma-delta (γ , δ) permet de se passer de la présentation dépendante du complexe majeur d'histocompatibilité de type II.

L'injection parentérale à des animaux d'expérience de complexes HSP-peptides permet d'obtenir un
25 effet adjuvant remarquable (5, 6) déterminant ou amplifiant le pouvoir antigénique de ces peptides.

Certaines HSP de bactéries des familles HSP60 et HSP70 sont la cible de réponses immunes qui ont un rôle protecteur à l'égard de l'infection par ces germes.

30 Il a été proposé récemment de désensibiliser par voie orale en donnant des extraits peptidiques d'E. Coli contenant de la HSP60, à des patients atteint

d'arthrite rhumatoïde, avec un certain effet bénéfique (5, 6). Considérant le peu d'effet secondaire, les auteurs proposent de tenter l'essai sur d'autres affections inflammatoires pour manipuler une réponse dirigée contre
5 l'une de ces HSP microbiennes elle-même, considérée comme substitut d'un auto-antigène.

De manière inattendue, les Inventeurs ont découvert que les protéines de stress constituaient un vecteur remarquable pour présenter des peptides au systèmes
10 lymphoïde du tube digestif et induire une tolérance. Les protéines de stress des bactéries saprophytes semblent être les plus abondantes naturellement dans la lumière digestive. Il est probable aussi que les peptides issus de la digestion alimentaire constituent la masse la plus
15 abondante des fragments antigéniques disponibles à la formation de complexes HSP-peptides. Cependant, l'abondance des peptides générés, et la quantité présumée limitée des HSP bactériennes rend aléatoire la formation d'une quantité immunologiquement efficiente de ces complexes HSP-peptides
20 antigéniques, et ceci d'autant que la quantité absorbée d'antigène à visée désensibilisante est très faible (quelques dizaines de μg), en regard de la charge protéique alimentaire.

Les Inventeurs ont proposé de favoriser la
25 formation de ces complexes avant l'arrivée dans le tube digestif, c'est à dire in vitro, en utilisant des protéines de stress de E. Coli purifiées et des peptides issus de la digestion pepsinique de la BLG.

c) Utilisation de tests de compétition entre anticorps
sériques et monoclonaux pour la BLG

Les deux anticorps monoclonaux dénommés
ci-après M6 et M7 reconnaissent chacun un épitope
5 conformationnel différent sur la molécule de BLG. On
utilise leurs propriétés qualitatives différentes comme
marqueur de reconnaissance d'épitopes singuliers dans une
compétition avec l'ensemble des anticorps sériques d'un
sujet. Il ressort d'études cliniques que les sujets
10 symptomatiques et les sujets asymptomatiques reconnaissent
sur cette molécule des épitopes qui pour une part au moins,
sont différents (7), ce que l'on dénomme ci-dessous les
profils épitopiques.

L'épitope reconnu par M6 est particulièrement
15 bien reconnu par les sujets allergiques et symptomatiques.
La fixation de l'anticorps M6 sur la BLG intacte est en
effet mieux inhibée par les sérums d'enfants allergiques au
lait que ceux de sujets non allergiques, qu'il s'agisse
d'enfants ou d'adultes en bonne santé (donneurs de sang).

20 L'épitope reconnu par M7 est mieux reconnu
par les sujets asymptomatiques que par les sujet
allergiques. La fixation de l'anticorps M7 sur la BLG est
mieux inhibée par les sujets asymptomatiques que par les
sujets allergiques.

25 On utilise la compétition de liaison
antigénique contre M6 comme indice de spécificité
représentant du profil d'épitopes reconnu par les sujets
allergiques, et complémentaiement la compétition contre M7
comme indice de spécificité représentant du profil
30 d'épitopes reconnu par les sujets asymptomatiques.

La validation de cette interprétation a été
confirmée longitudinalement par des études cliniques.

L'acquisition d'un état de tolérance au lait s'accompagne d'une conversion de la spécificité fine des anticorps sériques, vers le profil typique des sujets asymptomatiques.

5 C'est cette discrimination d'épitopes exprimée à l'échelon des anticorps circulants qui sert ici d'outil d'analyse pour l'influence de la modulation antigénique orale.

10 B. Modèle expérimental

Des souris syngéniques ont reçu, dans leur eau de boisson, de très faibles quantités de peptides issus de la digestion pepsinique de bêta-lactoglobuline (BLG) préalablement couplés ou non avec des protéines de stress
15 purifiées et dont la capacité fonctionnelle était intacte (capacité de se lier à des peptides ou des protéines altérées).

a) Origine animale et conditions d'élevage

20 40 individus de 8 à 16 semaines ont été prélevés dans un élevage de souris Balbc soumises depuis plusieurs générations à une alimentation pauvre en lait de vache : 30 µg de bêta-lactoglobuline / gramme de granulés nutritifs.

25

b) Préparation des complexes antiqéniques

La BLG a été digérée au contact de pepsine couplée à de l'agarose (Sigma) dans des conditions de digestion incomplète, puis filtrée sur filtre de 10000
30 Daltons. La concentration du produit de digestion (pB) a été mesurée par spectrophotométrie (rendement de 30 à 50% de la protéine intacte).

Des solutions en tampon phosphate (PBS) de 1 μ g/ml ont été incubées avec des solutions de 1 μ g/ml des protéines de stress des E. Coli suivantes : DnaK, DnaJ, GroEL, GrpE (Stressgen) pendant une heure au moins à 5 température ordinaire. Des aliquots de 1 ml de chaque combinaison ont été congelés.

c) Groupes de traitement et posologie des complexes par voie orale

10 Une solution de complexes (1 ml) a été ajoutée, après dégel, au biberon d'eau de 100 ml quotidiennement distribué pour chaque cage de quatre souris. Chaque type de complexe est administré à 8 souris. Un groupe contrôle reçoit de l'antigène pB non complexé.

15 La solution a été ajoutée 3 fois par semaine durant deux semaines (soit six fois), à partir du temps zéro.

d) Réponse anticorps

20 Un prélèvement individuel de sang a été réalisé dans le plexus rétro-orbitaire au temps zéro et après 4 semaines. Les animaux sont anesthésiés à l'éther puis exsanguinés, au bout de 8 semaines.

La spécificité des anticorps sériques a été 25 examinée par un test de compétition de type ELISA.

e) Test de spécificité d'anticorps par compétition

Des plaques multipuits en polystyrène sont passivement recouvertes, par absorption à température 30 ordinaire, d'une faible quantité de BLG (0,3 μ g/ml en tampon bicarbonate), puis saturées par de la gélatine (1%, poids/vol - Haemacel (R)).

Le sérum de souris est dilué au 1/100 en tampon de dilution (PBSdil) constitué de : PBS-EDTA (10 mM) - Tween 20 (0,05%) - gélatine (Haemacel-1%).

Deux anticorps monoclonaux de souris produits
5 ont été sélectionnés pour leur spécificité à l'égard d'épitopes conformationnels de la BLG. Ils ont été biotinés et sont utilisés à leur dilution limite de fixation antigénique définie de la façon suivante : celle qui permet un signal maximal mais sensible à toute réduction de la
10 charge en antigène, à sa propre dilution, et inhibable par la compétition avec un pool de sérums de souris non traitées. Celles-ci produisent en effet des anticorps naturels contre la BLG, en relation avec l'exposition antigénique alimentaire, même minime.

15 100 µl de sérum dilué et d'anticorps biotiné sont mélangés dans un puits, en double exemplaire.

Après une incubation d'une nuit à température ordinaire, la fixation de l'anticorps monoclonal est mesurée par la rétention proportionnelle de biotine révélée
20 par captation de streptavidine couplée à de la peroxydase de raifort. Celle-ci colore un substrat d'orthophénylène diamine. La densité optique (D.O.) est mesurée par spectrophotométrie. Le bruit de fond (b.f) est mesuré dans des puits sans antigène. La fixation maximale est définie
25 soit en l'absence de compétition (anticorps monoclonal seul), soit en présence de sérum particulièrement peu inhibiteur.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'inhibition de fixation de l'anticorps monoclonal par :
30 % inhib = $100 \times (D.O. \text{ du test} - D.O. \text{ b.f.}) / (D.O. \text{ maximale} - D.O. \text{ b.f.})$

La correspondance entre profil d'épitopes reconnus sur l'antigène et l'état clinique du sujet (tolérance ou pas) est confirmée par d'autres exemples :

- modèle d'allergie aux acariens :

- 5 l'évolution de la spécificité fine des anticorps anti-acariens chez des enfants allergiques montre l'existence d'un profil d'épitopes sous l'effet de la désensibilisation induite tant par voie parentérale qu'orale,

- 10 - l'évolution des anticorps

g) Résultats

La figure 1 résume les données de l'expérimentation :

15

Inhibition de l'anticorps M6

Sur la partie gauche, sont représentées les évolutions des moyennes d'inhibition (+ écart type) de la fixation de l'anticorps monoclonal M6 par les sérums
20 individuels, pour les différents groupes de traitement.

Les données chiffrées sont reprises dans le tableau 1.

Le groupe contrôle recevant les peptides digérés à la pepsine (pB) voit sa capacité moyenne
25 d'inhibition augmenter de 45 à 60% et 59% après 4 et 8 semaines. Cette variation est significative ($p < 0.05$ - test T pairé) par rapport au départ, mais stable après 4 semaines.

Pour le groupe recevant les complexes de
30 DnaK-pB, cette capacité passe de 48 à 56% puis 77% sur la même période, cette dernière étant plus importante que dans le groupe contrôle ($p < 0.01$ - test T non pairé) et très

significative par rapport au temps zéro ($p < 0.001$ - T pairé).

De même, les groupes recevant les complexes DnaJ-pB, GroEL-pB et GrpE-pB montrent une élévation très-
5 significative après 4 semaines et qui s'accroît encore à la huitième semaine (située bien au dessus de la valeur du groupe contrôle pour les complexes GroEL-pB et GrpE-pB au moment correspondant).

10 Inhibition de l'anticorps M7

Sur la partie droite de la figure 1, sont représentées les évolutions des moyennes d'inhibition (+ écart type) de la fixation de l'anticorps monoclonal M7, par les sérums individuels, pour les différents groupes
15 traités.

Les données chiffrées sont reprises dans le tableau 2.

Le groupe contrôle recevant les peptides de BLG digérés par pepsine (pB) ont une capacité moyenne
20 d'inhibition qui diminue de 70 à 52% et 57% en 4 et 8 semaines. Cette variation est significative ($p < 0.01$ - test T pairé), quoique stable après 4 semaines.

Pour le groupe recevant les complexes DnaK-pB, cette capacité se réduit déjà significativement à la
25 quatrième semaine, en passant de 68 à 51%, comme dans le groupe contrôle.

Mais le résultat s'effondre à 17% à la huitième semaine ($p < 0.001$ - T pairé), ce qui est nettement inférieur à celui du groupe contrôle pour le prélèvement
30 correspondant ($p < 0.01$ - test T non pairé).

L'évolution est parallèle à celle-ci pour le groupe traité avec les complexes de DnaJ-pB.

Pour le groupe recevant des complexes de GroEL-pB, la réduction du pouvoir inhibiteur est d'emblée maximale, atteignant les 28% dès la quatrième semaine, et demeure au même niveau, de 30% à la huitième semaine.

5 Dans le groupe recevant des complexes GrpE-pB, la réduction du pouvoir inhibiteur est aussi d'emblée maximale, passant de 72 à 22% dès la quatrième semaine, mais semble s'amenuiser ensuite en revenant à un taux moyen de 41%.

10

h) Conclusion

L'administration de peptides issus de la digestion enzymatique d'un antigène majeur du lait, en l'occurrence la bêta-lactoglobuline, sous la forme de
15 complexes liés à des protéines de stress selon l'invention, et par la voie orale, entraîne une modification radicale et très rapide du profil des épitopes reconnus par les anticorps circulants. Ces anticorps sont présents naturellement chez tous les sujets exposés à l'antigène par
20 leur alimentation. Dans un modèle de souris, exposées chroniquement à une quantité faible de l'antigène par cette voie, la dose d'antigène administrée durant un bref laps de temps est très faible, loin en dessous de la quantité ingérée naturellement (estimation 0,25 µg par sujet et par
25 jour de traitement sous forme de complexes et 150 µg par sujet et par jour dans l'alimentation courante).

La rapidité du changement est d'autant plus remarquable que la demi-vie des anticorps sériques, principalement des IgG est de 3 semaines, ce qui signifie
30 qu'à la huitième semaine, il devrait encore subsister le quart des anticorps présents à la fin du traitement de seulement 2 semaines. Toutes les protéines de stress

utilisées ont été efficaces. Dans une deuxième expérience avec des complexes DnaK-pB, une tentative de déterminer une dose limite inférieure n'a pas abouti malgré l'usage de doses jusqu'à 10 fois inférieures (0,1 µg / biberon de 5 100 ml / 3 jours par semaine).

C. Tolérance induite oralement à l'égard d'antigènes d'histocompatibilité majeurs

1. Modèle expérimental

10 Des animaux syngéniques (souris Balbc) reçoivent une préparation protéique dissoute dans leur eau de boisson. Elle contient des fragments d'antigènes d'histocompatibilité de souris syngéniques d'une autre souche, dont elles rejetteraient toute greffe (souris C3H).

15 L'effet tolérogène est attendu de manière renforcée lorsque ces fragments sont associés à une protéine de stress de bactérie (ici Dnak de E. Coli).

A titre de contrôle, un groupe de souris recevra de la même manière un complexe de Dnak avec des 20 fragments peptidiques, obtenus de façon analogue, à partir de la bêta-lactoglobuline (antigène majeur du lait).

On devrait s'attendre à ce que la sensibilisation orale doit atténuer de façon spécifique la réactivité lymphocytaire à l'égard d'une souche de 25 lymphocytes étrangers du même type que ceux utilisés pour la préparation orale et non vis-à-vis d'une troisième souche non apparentée.

2. Matériel et méthode

30 a) animaux :

3 groupes de 12 souris sont prélevées dans un élevage de souris syngéniques de souche Balbc sont élevées par cages

de 6 animaux. Chaque groupe reçoit pendant 2 semaines une des préparations suivantes dans le biberon d'eau de boisson à raison de 3 distributions par semaine (un jour sur deux et pas le week-end) et une dose de 1 μ g de complexe pour

5 100 ml d'eau :

- un complexe de Dnak-peptides de bêta-lactoglobuline (préparation contrôle)
- une solution de peptides de membrane lymphocytaire splénique de souris C3H digérée à la pepsine (contenant
- 10 des fragment d'antigènes d'histocompatibilité)
- un complexe de ces peptides associé au Dnak purifié de E. Coli (Stressgen)

b) test de tolérance acquise (in vitro)

15 Ce test est basé sur une culture lymphocytaire mixte unidirectionnelle.

Les cellules répondeuses sont isolées à partir de la rate des animaux à tester. Les cellules lympho-monocytaires sont obtenues après centrifugation sur

20 gradient de densité avec un mélange de ficoll-isopaque (Pharmacia). Elles sont resuspendues à l'aide de 4 millions de cellules/ml en milieu de culture RPMI 1640 tamponné à l'Hepes et au bicarbonate, supplémenté de

25 veau.

Les cellules stimulantes sont obtenues de la même manière de souris de souches différentes au niveau de leur MHC : la souche C3H et une souche domestique (DOM).

Elles sont incubées pendant une heure en

30 présence de mitomycine afin de bloquer leur potentiel de multiplication. Elles sont ensuite resuspendues dans les mêmes conditions que les cellules répondeuses.

Culture lymphocytaire:

Un volume égal de suspension (0,1 ml) de cellules répondeuses et de cellules stimulantes sont mélangés, en 3 exemplaires, dans des puits à fond rond de 5 plaques multipuits de culture en polystyrène pour être ensuite incubées durant 5 jours dans un incubateur à air/CO₂ (95/5%; vol/vol), humidifié, à 37,5 °C.

Chaque puits de microculture recevra 2 µC de thymidine tritiée à 2 C/mM (Amersham) 16 heures avant 10 l'arrêt de la culture qui se réalise à l'aide d'un appareil MASH II qui filtre chaque microculture sur une membrane de fibres de verre qui retient les noyaux cellulaires.

La radioactivité nucléaire de chaque culot, qui reflète l'incorporation de novo de thymidine dans de 15 l'ADN, est mesurée par comptage en scintillation liquide (Packard Tricarb).

Les résultats sont exprimés en Coups Par Minute et représentent la moyenne de 3 échantillons de la même culture à l'échelon individuel.

20

c) planification expérimentale

Les prélèvements ont lieu à 2 moments différents :

- durant la 3ème semaine qui suit le début de l'administration orale d'une des préparations,
- 25 - durant la 7ème semaine.

Les animaux sont sacrifiés en 3 fois par période .

Chaque expérience de culture comporte 2 animaux par groupe traité.

La culture lymphocytaire mixte est réalisée parallèlement :

- 30 a) vis-à-vis de cellules mitomycinées d'origine C3H
- b) vis-à-vis de cellules mitomycinées d'origine DOM

d) préparation des peptides

Des lymphocytes (20 millions) d'une souche de souris appropriée, sont isolés à partir de la rate. Il s'agit d'un mélange de lymphocyte T et B en quantités
5 approximativement égales et donc porteurs des antigènes de type I et II. Ils sont traités par ultrasons (3 x 10 sec) puis centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est collecté et recentrifugé de la même façon. Ensuite, le surnageant est centrifugé à 2 reprises à 8000 g. Le dernier
10 surnageant est enrichi en membranes cellulaires et débarrassé de débris de noyau cellulaire et d'appareil de Golgi. Il est soumis ensuite à une digestion par pepsine couplée à des billes d'agarose, à pH 2 en tampon glycine, pendant 1 heure 30 et à 37°C. Après centrifugation douce
15 pour séparer les billes d'agarose, et neutralisation à pH 7 par tampon TRIS, le mélange est filtré sur filtre (Millipore limite 10 kD). Le rendement est de l'ordre 500 µg de peptide (détermination par spectrophotométrie) dénommé LMp.

20 Une solution de 50 µg de peptide est mélangée à une solution de 50µg de Dnak (Stressgen) pour former un complexe Dnak-LMp.

Le complexe Dnak avec peptide de bêta-lactoglobuline (Bp) est constitué de la même manière en
25 utilisant des peptides issus de la digestion pepsinique de bêta-lactoglobuline purifiée (cf. supra).

3. RésultatsAu bout de 3 semaines de traitement (figure 2)

30 Le groupe de souris ayant reçu le complexe Dnak-LMp répond le moins bien à la stimulation de cellules C3H mitomycinées (C3Hm).

Ceci est différent ($p < 0.02$; T-test) du groupe qui a reçu le peptide LMp seul, et également celui qui a reçu le complexe témoin Dnak-Bp ($p < 0.01$; T-test).

Il faut cependant noter que l'administration
5 du peptide seul (sans Dnak) a également un effet, puisque ce groupe est significativement moins répondeur que le groupe témoin ($p < 0.01$; T-test).

Toutefois, la spécificité de l'inhibition de
réponse est garantie par le fait que la réactivité
10 lymphocytaire des trois groupes est équivalente à l'égard de cellules mitomycinées d'une troisième souche, non apparentée (DOMm).

Au bout de 7 semaines (figure 3), soit 4 semaines après
15 l'arrêt de l'administration orale

Les différences entre les 3 groupes restent bien marquées. Le groupe traité au Dnak-LMp est le plus inhibé tant à l'égard de celui qui a reçu le peptide membranaire seulement ($p < 0.02$; T-test) que le groupe témoin
20 ($p < 0.01$; T-test).

L'administration du peptide seul permet encore une atténuation de réponse vis-à-vis du groupe témoin ($p < 0.01$; T-test).

La spécificité de la réponse est encore une
25 fois vérifiée par le test parallèle vis-à-vis des cellules mitomycinées d'une souche non apparentée (DOMm) et où les 3 groupes traités différemment réagissent de la même façon.

L'administration de peptides obtenus par
30 digestion pepsiniques de lymphocytes spléniques de souches de souris caractérisées par une incompatibilité dans le système H-2 tant aux niveaux K et D que A-E en quantités

extrêmement faibles et pendant deux semaines, a pour effet d'atténuer fortement la réponse inconditionnelle de lymphocytes immuno-compétents, in vitro, qui signe d'habitude cette incompatibilité.

5 Cette atténuation est renforcée par la présentation de ce type de peptide sous la forme de complexes peptides-Dnak.

 Cette atténuation est spécifique et n'atteint en rien la capacité de réponse à l'égard d'une variété
10 différente, sans relation avec la souche utilisée pour la tolérisation.

D. Tolérance des souris syngéniques à l'égard d'une greffe de cellules allogéniques

15 1. Modèle et schéma expérimental

Souches de souris :

- Balbc pour les animaux rendus tolérants
- C3H pour les animaux donneurs de cellules à greffer (allogéniques) et de cellules stimulantes en culture
20 lymphocytaire mixte (MLC)

Elles sont élevées en cages de 6 animaux. Chaque groupe est constitué de 12 animaux par traitement.

Le traitement oral est effectué selon le protocole précédent.

25

Schéma expérimental :

Complexes administrés dans l'eau de boisson :

jours 0, 2, 4, 7, 9

Greffe allogénique : 20×10^6 cellules spléniques de C3H en
30 intra-péritonéal :

jour 16

Sacrifice, collecte de rates et mise en culture des cellules spléniques :

15 semaines après la greffe

5 Détection et numération des cellules allogéniques

a) Par la présence de cellules porteuses de MHC type II

Test fonctionnel en culture mixte syngénique bidirectionnelle

Les cellules spléniques de souris traitées et greffées sont mises en culture avec des cellules de souris syngéniques (Balbc) non traitées (naïves).

Normalement, il n'y a aucune réponse proliférative à attendre si le contenu des cellules spléniques d'animaux traités et greffés est uniquement composé de cellules syngéniques.

Par contre, la présence de cellules allogéniques, signalant la prise de greffe in vivo, devrait entraîner une prolifération de type MLC par les cellules dites naïves, non tolérantes, d'autant plus importante que le nombre de cellules étrangères est élevé.

Pour évaluer l'ordre de grandeur de la prise de greffe, une tentative de quantification relative de la réponse est effectuée par référence à une courbe dose/réponse obtenue en ajoutant des quantités connues et croissantes de cellules allogéniques C3H à une quantité identique de cellules naïves et répondeuses (200×10^3 cellules/puits).

b) Par la présence de cellules porteuses de MHC type I

Numération directe par immunofluorescence en cytofluorométrie de flux en utilisant un anticorps monoclonal de souris spécifique du MHC type I de la souris

C3H : H-2 kk (Serotec), couplé à la fluorescéine ou à la phycoérythrine sur une suspension de cellules spléniques.

2. Résultats

5 Comme présenté dans la figure 4, 15 semaines après la greffe péritonéale, les cellules spléniques du groupe traité par complexes DnaK-peptides de membranes lymphomonocytaires de souris C3H sont incapables de répondre à la stimulation par cellules C3H mitomycinées.

10 Ceci témoigne de l'induction d'une tolérance allogénique.

Le groupe traité par le peptide seul est également toléré dans une moindre mesure.

Le groupe traité par DnaK-peptide de bêtalactoglobuline n'est pas tolérant du tout.

15 Par ailleurs, les cultures mixtes stimulées par une autre population allogénique provenant d'une souche histoincompatible différente de C3H, sont toutes semblables. Ceci témoigne de ce qu'aucun traitement n'a altéré ni différencié la capacité de réponse en MLC, et que
20 l'effet du traitement est bien spécifique de la souche de souris dont proviennent les peptides de membranes.

Comme représenté dans la figure 5, on utilise la réponse en MLC de cellules d'animaux ni traités, ni greffés, pour révéler l'existence de cellules étrangères
25 dans un mélange de cellules spléniques d'animaux greffés, qui seraient donc ici d'origine C3H.

Il apparaît que les rates de souris traitées oralement avant la greffe par LMp et DnaK-LMp contiennent des éléments allogéniques puisqu'elles donnent lieu à une
30 réponse proliférative très significativement différente de la réponse du groupe contrôlé traité par un complexe DnaK-peptides irrelevants (bêtalactoglobuline). Ce dernier a une

réponse qui ne diffère pas du bruit de fond.

A titre comparatif, une série de cultures mixtes ont été menées parallèlement avec des quantités connues et croissantes de cellules C3H (figure 6). Elles
5 donnent lieu à une réponse proliférative proportionnelle à la quantité de cellules étrangères.

Le niveau de réponse moyen enregistré avec des cellules spléniques d'animaux greffés et tolérisés par complexes DnaK-LMp correspondrait à une teneur d'environ
10 30% de cellules C3H.

La présence de cellules du type greffé dans la rate est mesurée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps spécifique du MHC I de C3H (H-2kk) (table 5). Le groupe traité par DnaK-LMp en contient 14.7% en moyenne,
15 valeur significativement supérieure à celle des deux autres groupes.

Cette présence d'allo-antigènes n'est observable qu'à la condition de laisser reposer les cellules spléniques d'animaux greffés pendant au moins une
20 suit à 37 °C en l'absence de sérum. ceci suggère qu'il est indispensable de permettre la réexpression de ces antigènes dont la présence serait ainsi modulée in vivo, vraisemblablement par des anticorps anti-H-2kk. Ceci ajoute un autre mécanisme de tolérance de la greffe à la tolérance
25 purement adressée aux cellules T répondeuses.

Table 1

Inhibitions de l'anticorps monoclonal M6 liant le nBLG par des sérums de souris individuels : évolution en fonction du temps en fonction le type de complexe administré oralement.-

5

		% d'inhibition de la liaison de M6		
		Moyenne	Déviations standard	Nombre de cas
Groupe 1 : Contrôle (dBLG seulement)				
PREL	1	45.0100	8.4146	8
PREL	2	60.6750	3.9304	8
PREL	3	59.6338	17.4714	8
Groupe 2 : complexes dBLG-DnaK				
PREL	1	48.4350	7.0540	8
PREL	2	56.3675	5.6146	8
PREL	3	77.0975	3.8966	8
Groupe 3 : dBLG-				
PREL	1	23.7350	15.3990	8
PREL	2	65.7013	6.2958	8
PREL	3	65.3863	4.7270	8
Groupe 4 : dBLG-				
PREL	1	24.9538	4.7972	8
PREL	2	56.0100	4.3929	8
PREL	3	80.0287	1.9401	8
Groupe 5 : dBLG-				
PREL	1	37.3313	6.4248	8
PREL	2	56.6962	5.5641	8
PREL	3	87.1525	7.8731	8

Table 2

Inhibitions de l'anticorps monoclonal M7 liant le nBLG par des sérums de souris individuels : évolution en fonction du temps en fonction le type de complexe administré oralement...

5

		% d'inhibition de la liaison de M7		
		Moyenne	Déviations standard	Nombre de cas
Groupe 1 : Contrôle (dBLG seulement)				
PREL	1	70.0658	3.5541	8
PREL	2	52.8224	2.3458	8
PREL	3	57.0592	7.8996	8
Groupe 2 : complexes dBLG-DnaK				
PREL	1	68.9145	2.6698	8
PREL	2	51.6908	3.0857	8
PREL	3	17.2697	8.0473	8
Groupe 3 : dBLG-				
PREL	1	78.4276	3.4832	8
PREL	2	50.8553	3.9778	8
PREL	3	26.9145	3.2069	8
Groupe 4 : dBLG-				
PREL	1	73.9671	3.1679	8
PREL	2	28.5132	8.6072	8
PREL	3	30.2829	14.2174	8
Groupe 5 : dBLG-				
PREL	1	72.8355	4.7722	8
PREL	2	22.2961	9.5040	8
PREL	3	41.3684	6.4331	8

Table 3

Titres d'anticorps anti (natif) nBLG après transformations logarithmiques : évolution en fonction du temps en fonction le type de complexe administré oralement.

5

		Ln de titres (A. U.)		
		Moyenne	Déviati on standard	Nombre de cas
Groupe 1 : Contrôle (dBLG seulement)				
PREL	1	3.8526	.4547	8
PREL	2	4.2162	.3395	8
PREL	3	4.2059	.2946	8
Groupe 2 : complexes dBLG-DnaK				
PREL	1	3.9738	.7957	8
PREL	2	4.3749	.6353	8
PREL	3	3.2562	.5057	8
Groupe 3 : dBLG-				
PREL	1	3.7073	.4435	7
PREL	2	4.1348	.5475	8
PREL	3	4.3917	.5047	8
Groupe 4 : dBLG-				
PREL	1	4.3714	.4215	8
PREL	2	3.6419	.4704	8
PREL	3	3.9964	.2724	8
Groupe 5 : dBLG-				
PREL	1	4.1526	.6401	8
PREL	2	4.1739	.4464	8
PREL	3	3.6126	.4873	8

Table 4

Différences de l'inhibition entre la liaison des anticorps
M6 et M7 au nBLG :

		% d'inhibition de la liaison de M6 -% d'inhibition de la liaison de M7		
		Moyenne	Déviations standard	Nombre de cas
Groupe 1 : Contrôle (dBLG seulement)				
PREL	1	-25.0558	9.0035	8
PREL	2	7.8526	5.6470	8
PREL	3	2.5745	19.8676	8
Groupe 2 : complexes dBLG-DnaK				
PREL	1	-20.4795	8.5253	8
PREL	2	4.6767	6.1131	8
PREL	3	59.8278	9.2686	8
Groupe 3 : dBLG-				
PREL	1	-54.6926	13.8705	8
PREL	2	14.8460	6.4665	8
PREL	3	38.4718	5.6903	8
Groupe 4 : dBLG-				
PREL	1	-49.0134	3.9824	8
PREL	2	27.4968	10.6337	8
PREL	3	49.7459	14.6732	8
Groupe 5 : dBLG-				
PREL	1	-35.5043	4.8959	8
PREL	2	34.4002	13.4093	8
PREL	3	45.7841	8.7931	8

Table 5

Cellules allogéniques persistantes (H-2kk +) dans les rates de souris Balbc greffées avec des cellules C3H :

Traitement oral		
DnaK-Bp	Lymphocyte Membrane peptide (LMp) seul	DnaK-LMp
1.0%	0.9%	14.2%
1.5	2.8	25.0
0.5	3.6	9.2
0.5	3.7	10.4
Moyenne ET	Moyenne ET	Moyenne ET
0.9% 0.5	2.7% 1.3	14.7% 7.2

T-tests couplés :

DnaK-LMp / DnaK-Bp : p = 0.026

DnaK-LMp / LMp : p = 0.052

REFERENCES

1. Patterson, R. et al., *Allergy Proc.*, Vol. 15 (5), pp. 239-264 (1994)
2. Ferrick, D.A., *Mak-TW Tolerance and Self-Reactivity in V gamma 1.1 C gamma 4 transgenic mice*
3. Staines, U. et al., *J. Rheumatol.*, Vol. 54 (3), pp. 145-154 (1995)
4. Polla, B.S. et al., *Clin. Exp. Allergy*, Vol. 23 (7), pp. 548-556 (1993)
- 10 5. Healy, A.M. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, Vol 663, pp. 319-330 (1992)
6. Revillard, J.P. et al., *Dev. Biol. Stand.*, Vol. 77, pp. 31-37 (1992)
7. Bousquet, J. et al., *Allergy*, Vol. 49, pp. 31-36 (1994)

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire comprenant avec un véhicule pharmaceutique et/ou alimentaire adéquat, une protéine de stress et au moins un des épitopes conformationnel ou séquentiel d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe ou une réaction allergique ou une réaction auto-immune.
2. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon la revendication 1, caractérisée en ce que le véhicule pharmaceutique et/ou alimentaire est adéquat pour une administration par voie mucosale ou par voie cutanée.
3. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la protéine de stress et l'épitope forment un complexe.
4. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'épitope est obtenu par une hydrolyse avantageusement enzymatique, de préférence à la pepsine, de ladite structure antigénique.
5. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la protéine de stress est une protéine bactérienne de stress.
6. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon la revendication 5, caractérisée en ce que la protéine bactérienne de stress est une protéine de stress d'une bactérie saprophyte.
7. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce que la protéine de stress est une

protéine de stress d'E. Coli.

8. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon la revendication 7, caractérisée en ce que la protéine de stress est choisie parmi le groupe
5 constitué par la protéine de stress GroEL, GrpE, DnaK, ou DNAJ.

9. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la structure
10 antigénique est un allergène choisi parmi le groupe constitué par les antigènes majeurs allergiques présents dans le lait, en particulier la bêta-lactoglobuline bovine (BLG) issue du lait de vache, les antigènes majeurs allergiques présents dans les végétaux, en particulier dans
15 les pollens, dans les poils d'animaux, dans les venins d'animaux, en particulier dans le venin de guêpe, les antigènes majeurs de la réaction allergique aux acariens, à la mite présente dans la poussière de maison (antigène P1 du Dermatophagoides pteronyssinus), l'antigène majeur de
20 l'Aspergillus fumigatus, l'entérotoxine B staphylococcalle (SEB) et le locus majeur d'histocompatibilité de type I ou II.

10. Composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications
25 précédentes caractérisée en ce qu'elle comporte un immunosuppresseur, de préférence choisi parmi le groupe constitué par l'azathioprine, les stéroïdes, les globulines anti-lymphocitaires, la cyclosporine A, la rapamycine, le KF506 (tacrolimus), ou des lymphokines, leurs analogues,
30 leurs agonistes ou un mélange d'entre eux.

11. Utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des

revendications précédentes pour la préparation d'un médicament destiné à modifier la réponse immunitaire d'un patient vis-à-vis d'une structure antigénique spécifique d'une pathologie liée à un rejet de greffe, une réaction
5 allergique ou une réaction auto-immune.

12. Utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 pour la préparation d'un médicament destiné à la désensibilisation d'allergies atopiques ou non
10 atopiques.

13. Utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des maladies auto-
15 immunes, en particulier les pathologies choisies parmi le groupe constitué par les infections liées au SLE (Systemic Lupus Erythematosus disease), le syndrome Gougerot-Sjögren (ou pathologie Sjögren), la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que les pathologies du type sarcoïdosis et osteopenia,
20 spondylarthritis, scleroderma, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, hyperthyroidism, maladie d'Addison, auto-immune haemolytic anaemia, maladie de Crohn, syndrome de Goddpasture, maladie de Graves, Hashimoto's thyroiditis, idiopathic purpura haemorrhagica,
25 diabètes insulino-dépendants, myasthenia, pemphigus vulgaris, pernicious anaemia, poststreptococcal glomerulonephritis, psoriasis et stérilité spontanée.

14. Utilisation de la composition pharmaceutique et/ou alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention de rejets de greffe.
30

1/4

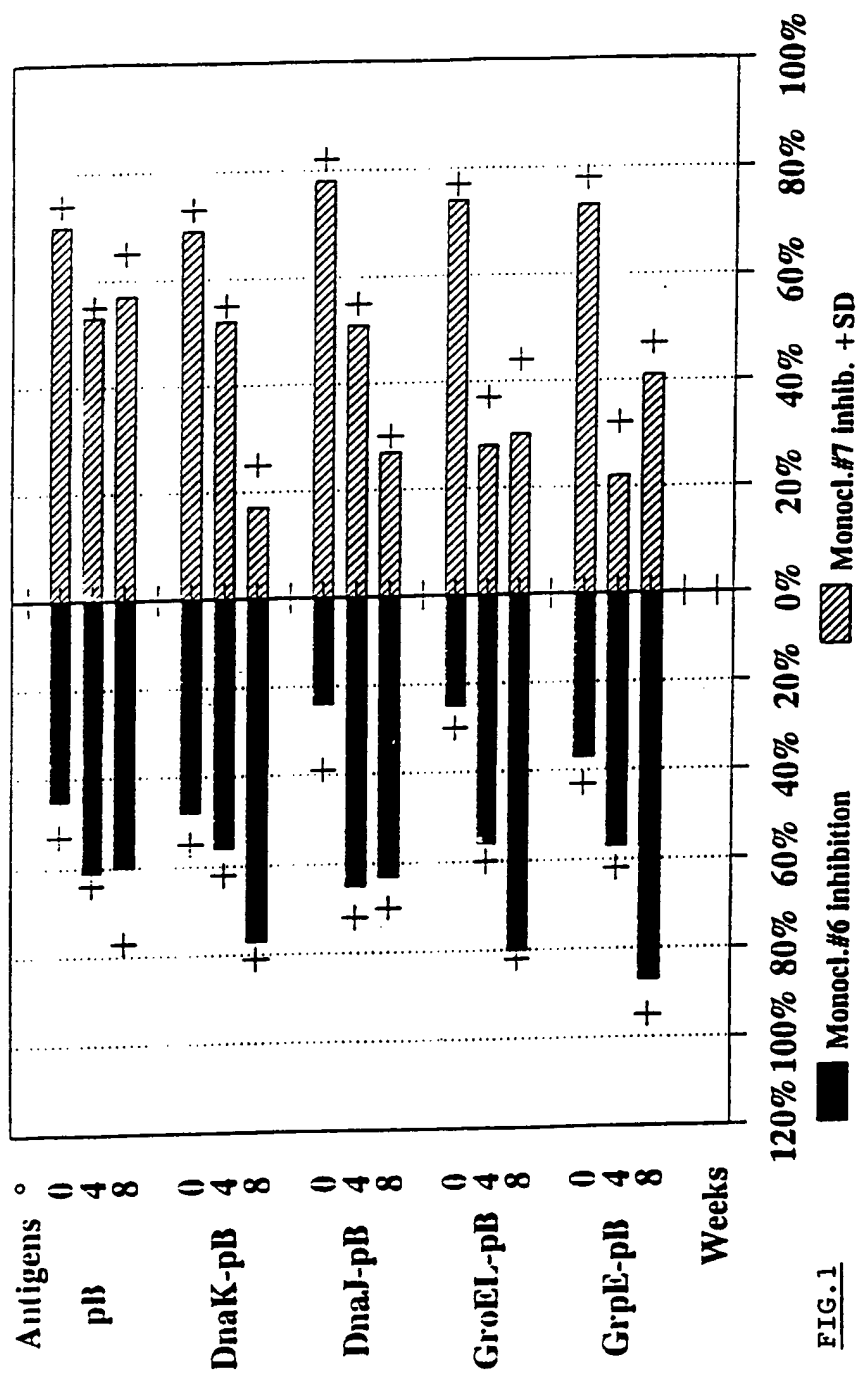
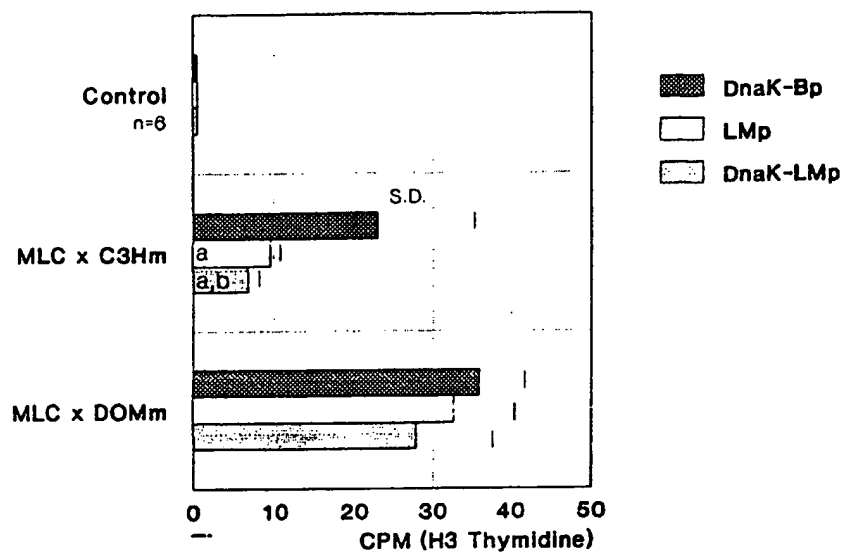
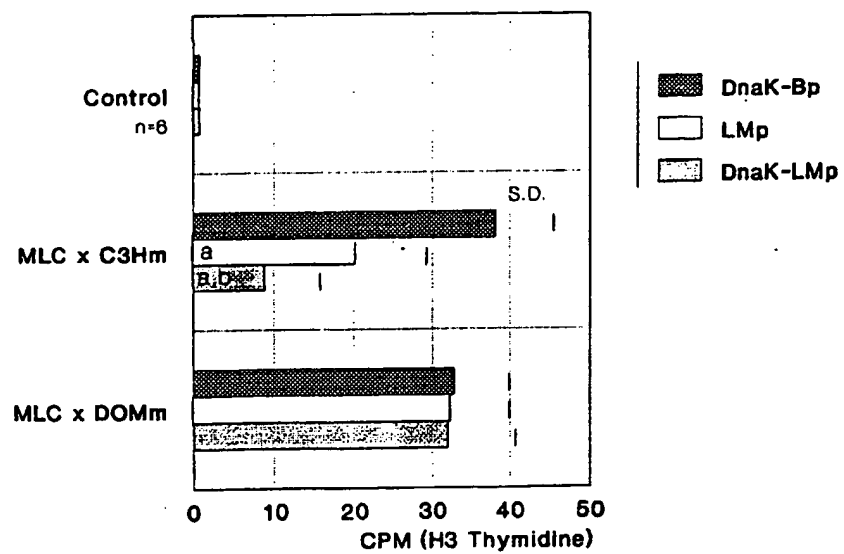
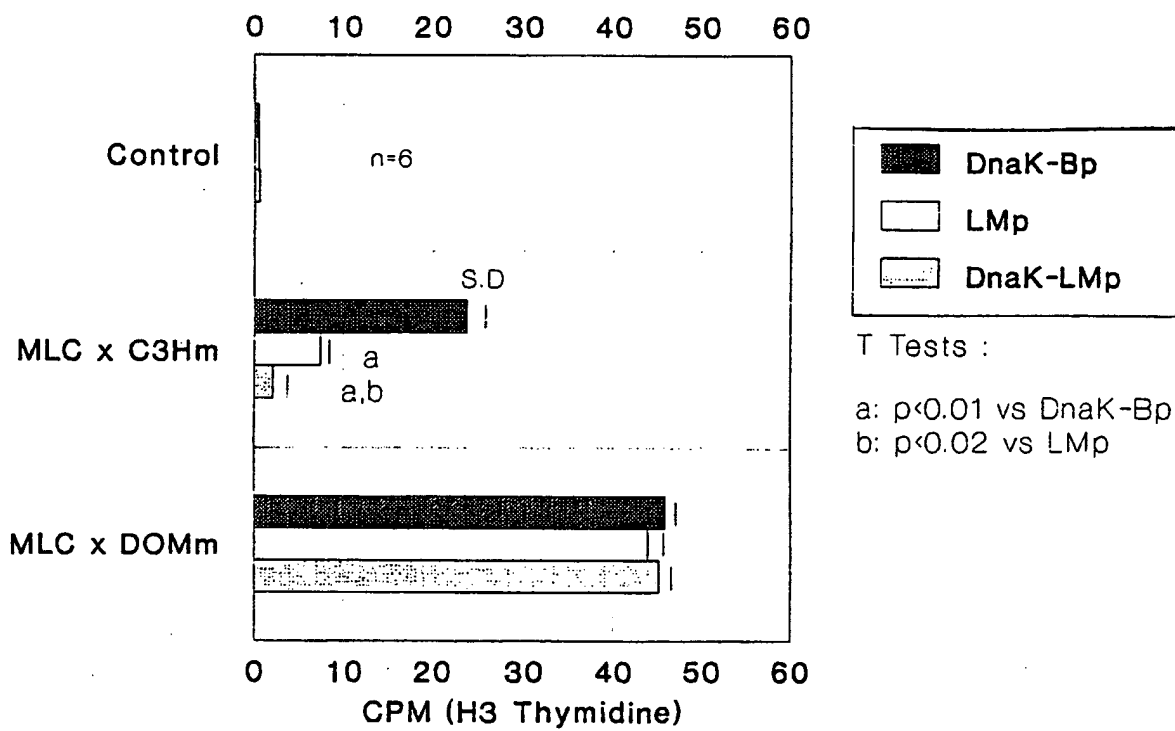


FIG. 1

**FIG. 2****FIG. 3**

**FIG.4**

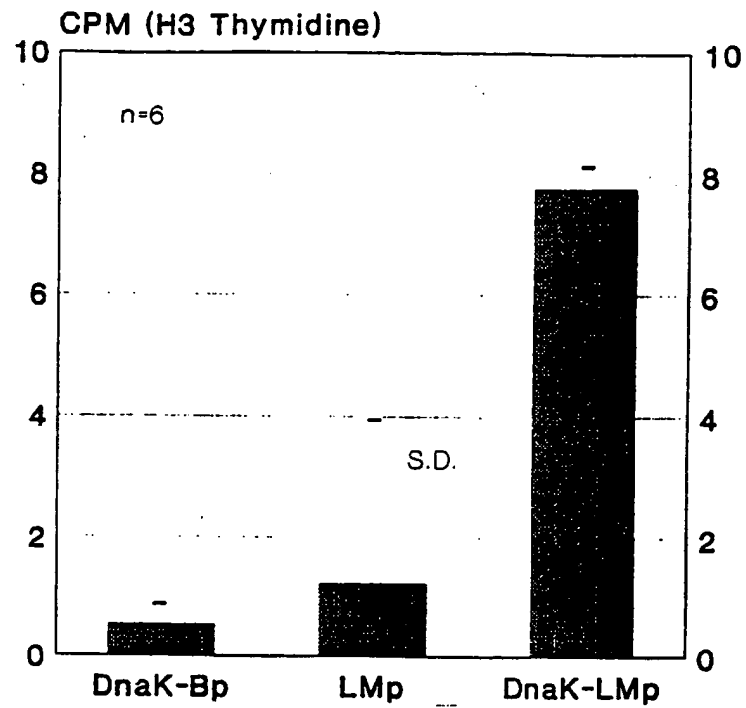


FIG. 5

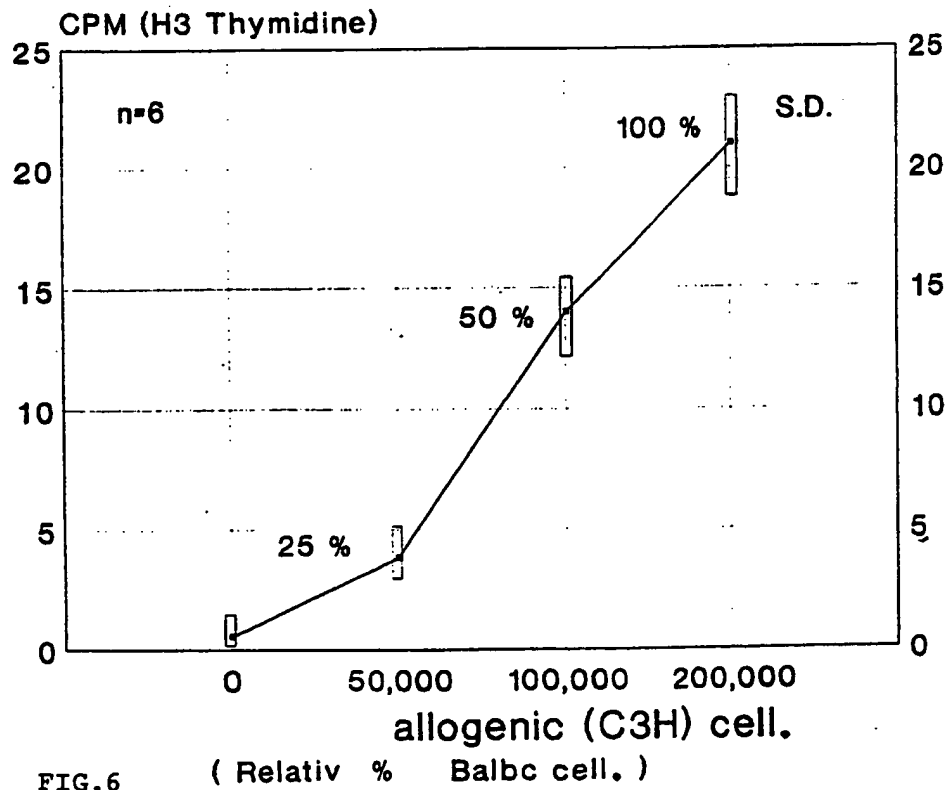


FIG. 6



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/108, 39/00, 39/35 // (A61K 39/108, 39/00), (A61K 39/35, 39/108)	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/39029 (43) Date de publication internationale: 11 septembre 1998 (11.09.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00030 (22) Date de dépôt international: 5 mars 1998 (05.03.98) (30) Données relatives à la priorité: 9700199 5 mars 1997 (05.03.97) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES [BE/BE]; Avenue F.D. Roosevelt 50, B-1050 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUCHATEAU, Jean [BE/BE]; Rue des Champs-Elysées 60, B-1050 Bruxelles (BE). SERVAIS, Geneviève [BE/BE]; Chemin de la Noire Agasse 2, B-7060 Horrues (BE). (74) Mandataires: VAN MALDEREN, Eric etc.; Office Van Malderen, Place Reine Fabiola 6/1, B-1083 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 14 janvier 1999 (14.01.99)
(54) Title: PHARMACEUTICAL OR FOOD COMPOSITION FOR TREATING PATHOLOGIES RELATED TO GRAFT VERSUS HOST, ALLERGIC OR AUTOIMMUNE REACTION (54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE OU ALIMENTAIRE POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES LIEES A UN REJET DE GREFFE, UNE REACTION ALLERGIQUE OU AUTO-IMMUNE (57) Abstract <p>The invention concerns a pharmaceutical and/or food composition comprising a suitable pharmaceutical and/or food vehicle and a heat shock protein and at least conformation or sequential epitopes of an antigenic structure inducing a graft versus host, an allergic or autoimmune reaction.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne une composition pharmaceutique et/ou alimentaire comprenant un véhicule pharmaceutique et/ou alimentaire adéquat ainsi qu'une protéine de stress et au moins un des épitopes conformationnel ou séquentiel d'une structure antigénique induisant un rejet de greffe, une réaction allergique ou auto-immune.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Liuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1. International Application No

PCT/BE 98/00030

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/108 A61K39/00 A61K39/35 //(A61K39/108,39:00),
(A61K39/35,39:108)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 98 23735 A (MIZZEN LEE ;ANTHONY LAWRENCE S D (CA); STRESSGEN BIOTECHNOLOGIES C) 4 June 1998 see page 14, line 6 - page 29, line 6 ----	1-14
X	WO 95 24923 A (SINAI SCHOOL MEDICINE ;SRIVASTAVA PRAMOD K (US); UDONO HEIICHIRO () 21 September 1995 see page 10, line 23 - page 15, line 10 ----	1-3,5-8, 10
X	WO 94 29459 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST) 22 December 1994 see page 6, line 5 - page 8, line 31 see page 21, line 30 - page 22, line 35 see page 23, line 16 - page 24, line 31 ----- -/--	1-3,5-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 1998

Date of mailing of the international search report

19/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

I. International Application No

PCT/BE 98/00030

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 06821 A (SLOAN KETTERING INST CANCER ;HOE MEE H (US); HOUGHTON ALAN (US); M) 27 February 1997 see page 10, line 18 - page 16, line 31 -----	1-4, 9, 11-13
X	STEPHANIE KÖNEN-WAISMAN ET AL.: "SELF AND FOREIGN 60-KILODALTON HEAT SHOCK PROTEIN T CELL EPITOPE PEPTIDES SERVE AS IMMUNOGENIC CARRIERS FOR A T CELL-INDEPENDENT SUGAR ANTIGEN." JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol. 154, no. 11, 1995, pages 5977-5985, XP002083262 BALTIMORE US see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/BE 98/00030

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9823735 A	04-06-1998	AU 5112098 A	22-06-1998
WO 9524923 A	21-09-1995	AU 2100995 A	03-10-1995
		CA 2185651 A	21-09-1995
		EP 0750513 A	02-01-1997
		JP 10501520 T	10-02-1998
WO 9429459 A	22-12-1994	EP 0700445 A	13-03-1996
		JP 8510756 T	12-11-1996
WO 9706821 A	27-02-1997	AU 6849396 A	12-03-1997
		AU 6898496 A	12-03-1997
		AU 6952896 A	12-03-1997
		CA 2229543 A	27-02-1997
		EP 0851764 A	08-07-1998
		WO 9706685 A	27-02-1997
		WO 9706828 A	27-02-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C. .ndo internationale No

PCT/BE 98/00030

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K39/108 A61K39/00 A61K39/35 //(A61K39/108,39:00),
(A61K39/35,39:108)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	WO 98 23735 A (MIZZEN LEE ;ANTHONY LAWRENCE S D (CA); STRESSGEN BIOTECHNOLOGIES C) 4 juin 1998 voir page 14, ligne 6 - page 29, ligne 6 ---	1-14
X	WO 95 24923 A (SINAI SCHOOL MEDICINE ;SRIVASTAVA PRAMOD K (US); UDONO HEIICHIRO () 21 septembre 1995 voir page 10, ligne 23 - page 15, ligne 10 ---	1-3,5-8, 10
X	WO 94 29459 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST) 22 décembre 1994 voir page 6, ligne 5 - page 8, ligne 31 voir page 21, ligne 30 - page 22, ligne 35 voir page 23, ligne 16 - page 24, ligne 31 --- -/--	1-3,5-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 novembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19/11/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rempp, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C .nde Internationale No

PCT/BE 98/00030

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 97 06821 A (SLOAN KETTERING INST CANCER ;HOE MEE H (US); HOUGHTON ALAN (US); M) 27 février 1997 voir page 10, ligne 18 - page 16, ligne 31 ----	1-4, 9, 11-13
X	STEPHANIE KÖNEN-WAISMAN ET AL.: "SELF AND FOREIGN 60-KILODALTON HEAT SHOCK PROTEIN T CELL EPITOPE PEPTIDES SERVE AS IMMUNOGENIC CARRIERS FOR A T CELL-INDEPENDENT SUGAR ANTIGEN." JOURNAL OF IMMUNOLOGY., vol. 154, no. 11, 1995, pages 5977-5985, XP002083262 BALTIMORE US voir le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

C n de Internationale No
PCT/BE 98/00030

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9823735 A	04-06-1998	AU 5112098 A	22-06-1998
WO 9524923 A	21-09-1995	AU 2100995 A	03-10-1995
		CA 2185651 A	21-09-1995
		EP 0750513 A	02-01-1997
		JP 10501520 T	10-02-1998
WO 9429459 A	22-12-1994	EP 0700445 A	13-03-1996
		JP 8510756 T	12-11-1996
WO 9706821 A	27-02-1997	AU 6849396 A	12-03-1997
		AU 6898496 A	12-03-1997
		AU 6952896 A	12-03-1997
		CA 2229543 A	27-02-1997
		EP 0851764 A	08-07-1998
		WO 9706685 A	27-02-1997
		WO 9706828 A	27-02-1997